

刚毛柽柳天然居群遗传多样性初探*

张 娟, 尹林克, 张道远

(中国科学院新疆生态与地理研究所, 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要: 柽柳是荒漠地区主要的灌木资源树种。以刚毛柽柳为代表, 运用 RAPD 技术分析了广布于新疆境内 9 个刚毛柽柳 (*Tamarix hispida* L.) 天然居群的遗传多样性及居群间的遗传分化。10 条随机引物检测到 157 个可重复的位点, 其中多态位点 155 个, 占总位点数的 98.7%。由 Shannon 表型多样性指数和 Nei 基因多样性指数估计居群间遗传分化百分比分别为 62.5% 和 55.30%, 表明刚毛柽柳种内的遗传变异主要存在于居群间。根据以上结果, 我们认为新疆境内刚毛柽柳天然居群的遗传多样性很丰富, 居群间分化程度较高; 繁育系统属于一种自交和不完全异交混合的交配类型; 形成并维持其分布格局的主要因素是基因流的隔离。

关键词: 刚毛柽柳; RAPD; 遗传多样性; 遗传分化

中图分类号: Q 943 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253 - 2700(2003)05 - 0557 - 06

RAPD Analysis on Genetic Diversity of Natural Populations of *Tamarix hispida*

ZHANG Juan, YIN Lin-Ke, ZHANG Dao-Yuan

(Xinjiang Institute of Ecology and Geography, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China)

Abstract: This paper described the genetic diversity and population genetic structure of *T. hispida* L. in Xinjiang with the method of RAPD. The ten random primers chosen for analysis detected 157 repeatable loci in which 155 were polymorphic. The proportion of polymorphic loci was 98.7%. The genetic structure of population estimated by Shannon's phenotypic diversity index and Nei's genetic index were 62.5% and 55.30%. It states that most of the variation occurred among different populations. We also found that the genetic diversity of *T. hispida* in Xinjiang was high. It might be due to difference of situations and low gene flow. This species is a mixed-mating type.

Key words: *Tamarix hispida*; RAPD; Genetic diversity; Genetic differentiation

刚毛柽柳 (*Tamarix hispida* L.) 是柽柳属 (*Tamarix* L.) 植物中最耐盐碱的种类之一, 在新疆分布范围最广, 生态适应性很强, 生态幅度颇宽, 在荒漠区冲积、淤积平原和河漫滩、湖盆边缘的潮湿和松陷盐土上, 以及盐碱化草甸和砂丘低地上皆能生长 (中国植物志编委会, 1979); 具有耐干旱、抗盐碱、耐贫瘠、耐风蚀沙埋等优良性状, 是防风固沙、

* 基金项目: 中国科学院“生物区系特别支持费”项目及中国科学院“西部之光”项目 (992003)

收稿日期: 2003 - 02 - 16, 2003 - 05 - 15 接受发表

作者简介: 张娟 (1978 -) 女, 硕士研究生, 主要从事植物分子生态学研究。E-mail: zj2002saisai@sina.com

造林绿化、水土保持的优良树种，对改造沙漠气候具有重要的意义；是荒漠、半荒漠地区主要的燃料、肥料及饲料来源，并可作染料和香料、还可入药，具有广泛的经济和药用价值（刘铭庭，1995）。作为荒漠地区主要的灌木资源树种，长期以来对本属植物的研究多集中在形态解剖（魏岩等，1999）、生理生态（曾凡江等，2002）、植物化学（程争鸣等，2000）、细胞学（翟诗虹，1986）等方面，试图以此揭示柽柳属植物由于即可自花授粉又可异花授粉而造成的种内、种间的遗传多样性，但从种子形态、花粉形态、染色体方面的研究结果均表明无法区分种内、种间的遗传分化及变异大小。

RAPD（Random Amplified Polymorphic DNA，随机扩增多态性 DNA）分子标记自 1990 年问世以来，以其简便、快速、经济的优点被广泛应用于遗传多样性和保护生物学中，在检测、确定物种或种群内的基因结构组成、变异及其种间的遗传和进化关系方面，显示出了巨大的潜力（Williams，1990）。

本文应用 RAPD 技术对分布在新疆的刚毛柽柳居群内、居群间的遗传分化及遗传结构的进行初步研究，旨在揭示其遗传多样性的水平，为种质资源的合理利用和荒漠区抗性基因的筛选与克隆提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

植物材料采自新疆境内 9 个天然分布的居群：A. 库尔勒—轮台；B. 塔里木河流域；C. 轮南；D. 新和—阿克苏；E. 阿拉尔—阿克苏；F. 阿克苏—巴楚；G. 库车—轮台；H. 尉犁；I. 焉耆盆地。伴生种多为盐爪爪（*Kalidium foliatum*）、胖姑娘（*Karelinia caspica*）、盐穗木（*Halostachys caspica*）、骆驼刺（*Alhagi sparsifolia*）、碱蓬（*Suaeda glauca*）等，每个居群分单株隔 150 m 采集 20 ~ 30 株当年生绿色营养小枝及小叶，野外迅速用硅胶干燥。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 的提取 采用高盐低 pH 法提取基因组 DNA（邹喻萍等，1994；张娟等，2003）。DL2000 + 15000 作为 DNA Marker，1 × TAE（pH 8.0）为电泳缓冲液，80V 电压下，以 0.7% 琼脂糖凝胶电泳（0.5 ug/ml 的溴化乙锭染色）检测提取的基因组 DNA 片段的大小及纯度；UV - 721 型紫外分光光度计下分别测定 A₂₆₀ 和 A₂₈₀ 值，检测 DNA 的浓度，- 20℃ 保存。

表 1 用于 RAPD 分析的随机引物及序列

Table 1 Random oligonucleotide primers and sequences

引物 Primer	序列 5'→3' Sequence 5'→3'
S121	ACGGATCCTG
S132	ACGGTACCAG
S146	AAGACCCCTC
S147	AGATGCAGCC
S159	ACGGCGTATG
S160	AACGGTGACC
S172	AGAGGGCACA
S173	CTGGGGCTGA
S174	TGACGGCGGT
S175	TCATCCGAGG

1.2.2 引物筛选 从 60 条 Sangon 公司的随机引物中筛选出 10 条扩增产物稳定、重复性好的引物对所有个体的基因组 DNA 进行扩增。引物序列见表 1。

1.2.3 RAPD 扩增及产物分离 通过 PCR 反应参与物的浓度梯度实验，优化反应条件，最终确定反应体系的总体积为 25 μl，包括：10 × Buffer（Mg²⁺ Free）2.5 μl；MgCl₂ 2 mmol/L；Taq DNA 聚合酶 1U；Primer 2.5 μmol/L；dNTP Mixture 150 μmol/L；模板 DNA 3 ng ~ 6 ng；ddH₂O 补足，反应混合物用 20 μl 的液体石蜡覆盖。PCR 扩增程序为：95℃ 预变性 2 min；94℃ 变性 40 s，36℃ 退火 1 min，72℃ 延伸 2 min，40 个循环；最后 72℃ 延伸 7 min。

PCR 扩增试剂均选用上海 Sangon 生物工程公司产品，在 PERKIN ELMER 公司 GeneAmp™ PCR System 2400 型热循环仪中进行。扩增产

物以 DL2000 + 1 5000 作为 DNA Marker，在含 EB 的 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳分离，电泳缓冲液为 1 × TAE (pH 8.0)，电压 100 V。凝胶自动成像系统 Alpha Innotech Transilluminator Model TM - 26 拍照保存结果。

1.3 RAPD 数据处理

1.3.1 多态位点比率 对电泳中能稳定清晰出现的扩增片段（条带）记为 1，无扩增产物或条带淡、模糊、不稳定的记为 0，得到一个二元数据表征矩阵。在某一特定位点上，扩增的 DNA 片段出现的频率小于 0.99 的位点即为多态位点。多态位点的比率 $P = \text{多态位点数} / \text{检测到的位点数}$ 。

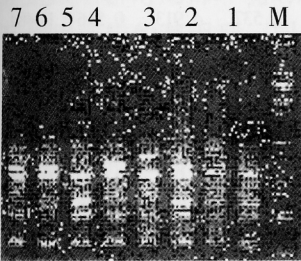


图1 引物 S121 在 B 居群不同样品中的扩增结果
Fig. 1 RAPD profiles of B population of *T. hispida* amplified by primer S121 (M is marker)

1.3.2 刚毛怪柳遗传结构特征的分析 分别采用 Shannon 表型多样性指数 (King & Schaal, 1989) 和 Nei 基因多样性指数 (Nei, 1973) 计算刚毛怪柳居群内、居群间的遗传多样性及居群间的遗传分化系数 (G_{ST})，公式略。

2 实验结果

2.1 多态位点比率

扩增得到的 DNA 片段长度介于 200 ~ 2500bp 之间 (图 1)。每条引物可检测到 13 ~ 21 个位点，10 条引物共检测到 157 个位点，其中多态位点数 155 个，总的多态位点百分率达 98.7%。不同居群检测到的位点数及多态位点百分率不同 (表 2)。

表 2 10 条引物检测 9 个居群位点数 (多态百分率)

Table 2 The number of loci and the percentage of polymorphic loci detected by 10 primers in 9 natural populations of <i>T. hispida</i>												
引物 primer	单个引物扩增的位点数 (多态位点所占百分比) Loci of every population (proportion of polymorphic loci)											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	II		
S121	4 (0.0)	12 (50.0)	11 (81.8)	12 (83.3)	11 (54.5)	9 (100)	11 (100)	14 (85.7)	12 (58.3)	21 (100)		
S132	6 (33.3)	7 (57.1)	8 (50.0)	10 (80.0)	9 (55.6)	5 (20.0)	5 (60.0)	12 (50.0)	8 (50.0)	14 (92.9)		
S146	7 (42.9)	11 (72.7)	10 (100)	9 (55.6)	13 (69.2)	10 (80.0)	8 (100)	7 (71.4)	14 (78.6)	18 (100)		
S147	8 (62.5)	13 (46.2)	7 (57.1)	9 (77.8)	12 (41.7)	9 (44.4)	6 (33.3)	11 (54.5)	11 (63.6)	16 (100)		
S159	11 (63.6)	8 (100.0)	11 (81.8)	5 (80.0)	9 (88.9)	8 (62.5)	7 (57.1)	5 (80.0)	9 (66.7)	14 (100)		
S160	7 (85.7)	10 (40.0)	6 (100.0)	11 (81.8)	9 (88.9)	4 (100)	5 (60.0)	10 (70.0)	10 (90.0)	18 (100)		
S172	5 (60.0)	11 (90.9)	6 (66.7)	7 (71.4)	9 (77.8)	4 (50.0)	6 (66.7)	8 (50.0)	12 (66.7)	13 (100)		
S173	5 (80.0)	7 (42.9)	9 (77.8)	8 (75.0)	7 (100.0)	4 (50.0)	7 (71.4)	7 (85.7)	9 (77.8)	14 (100)		
S174	8 (25.0)	11 (72.7)	10 (40.0)	9 (66.7)	7 (85.7)	9 (55.6)	7 (42.9)	7 (57.1)	11 (72.7)	14 (92.9)		
S175	10 (70.0)	9 (77.8)	8 (87.5)	11 (81.8)	8 (87.5)	9 (22.2)	6 (0.00)	5 (80.0)	8 (62.5)	15 (100)		
I	71 (54.9)	99 (64.6)	86 (74.4)	91 (75.8)	94 (72.3)	71 (59.2)	68 (63.2)	86 (67.4)	104 (69.2)	157 (98.7)		

注: I (总位点数); II (总位点数和多态位点数)。Note: I (Total loci); II (Total loci and total proportion of polymorphic loci)。

2.2 Shannon 表型多样性指数

采用 Shannon 指数计算 9 个刚毛怪柳天然居群内、居群间的遗传多样性以及各自在总的种内遗传变异中所占的比例见表 3。

结果表明，不同的引物检测到每个居群的位点数及多态性不同，从 0.000 到 4.856；每个居群的平均遗传多样性指数在 1.491 ~ 2.830 之间。刚毛怪柳平均居群内遗传多样性 (H_{pop}) 为 2.246，平均种内遗传多样性 (H_{sp}) 为 5.981，在总的遗传变异中，有 37.6% 存在于居群内，群体间遗传变异占 62.5%。

表 3 由 Shannon 指数估计的居群内、居群间遗传多样性及遗传分化

Table 3 Genetic diversity within and among populations of *T. hispida* estimated by Shannon's index

primer	A	B	C	D	E	F	G	H	I	Hpop	Hsp	I	II
S121	0.000	2.103	3.241	4.513	2.528	4.159	4.746	4.856	2.444	3.177	8.789	0.361	0.639
S132	0.799	1.669	1.954	2.902	1.829	0.375	0.837	2.546	1.875	1.643	4.928	0.333	0.667
S146	1.074	2.981	3.646	2.281	3.925	3.355	2.583	1.779	4.055	2.853	8.351	0.342	0.658
S147	1.985	2.546	1.653	2.654	1.791	1.848	0.842	1.835	2.307	1.940	5.486	0.354	0.646
S159	2.098	3.404	4.077	1.878	3.574	2.406	1.467	1.355	2.574	2.537	4.913	0.516	0.484
S160	2.704	1.279	2.185	4.483	3.023	1.802	0.837	2.621	3.629	2.507	6.552	0.383	0.617
S172	1.424	4.215	1.750	2.028	2.852	0.480	1.467	2.061	2.682	2.107	5.105	0.413	0.587
S173	1.674	1.199	2.195	1.705	2.384	0.337	2.128	1.835	2.445	1.767	6.181	0.286	0.714
S174	0.686	3.480	1.480	2.291	2.358	2.329	1.046	1.368	2.695	1.970	4.481	0.440	0.560
S175	2.465	2.542	2.590	3.562	3.108	0.531	0.000	1.480	1.317	1.955	5.019	0.390	0.611
Mean	1.491	2.542	2.477	2.830	2.737	1.762	1.595	2.173	2.602	2.246	5.981	0.376	0.625

注：Hpop（居群内遗传多样性，Within-population genetic diversity）；Hsp（总遗传多样性 Total genetic diversity）
I（Hpop/Hsp，居群内遗传多样性所占比率 proportion of genetic diversity within-population）；II（（Hsp－Hpop）/Hpop，居群间遗传多样性所占比率 proportion of genetic diversity among populations）。

2.3 由 Nei 指数估计的种群基因多样性

所研究的群体为随机交配群体，因此可以假定为 Hardy-Weinberg 平衡群体，根据 Hardy-Weinberg 平衡定律，采用 Nei 基因多样性指数对 9 个刚毛柞柳群体内、群体间基因多样性和遗传分化进行计算。

结果表 4，可以看出各居群内平均基因多样性值在 0.1006 ~ 0.1803 之间。居群内基因多样性（ H_s ）平均为 0.146，种内基因多样性（ H_T ）为 0.327，群体间的遗传分化系数为 55.30%。就种群分化程度而言，Nei 指数的估计值要稍低 Shannon 指数估计的 62.5%。

表 4 刚毛柞柳居群内、居群间基因多样性及遗传分化（由 Nei 指数估算）

Table 4 Genetic differentiation and gene diversity within and among populations of *T. hispida*

primer	A	B	C	D	E	F	G	H	I	H_s	H_T	D_{ST}	G_{ST}
S121	0.0000	0.1071	0.1429	0.1890	0.1161	0.1696	0.1979	0.2247	0.1280	0.1417	0.3496	0.2079	0.5947
S132	0.0491	0.0960	0.1384	0.2098	0.1094	0.0156	0.0580	0.1763	0.1138	0.1074	0.2892	0.1818	0.6286
S146	0.1615	0.2656	0.2882	0.2101	0.3333	0.2882	0.2500	0.2101	0.3160	0.2581	0.4881	0.2300	0.4712
S147	0.1113	0.1543	0.0996	0.1563	0.1230	0.1055	0.0527	0.1113	0.1563	0.1189	0.3147	0.1957	0.6221
S159	0.1674	0.2188	0.2455	0.1272	0.2076	0.1563	0.0915	0.0938	0.1540	0.1625	0.2847	0.1222	0.4294
S160	0.1181	0.0712	0.1319	0.2153	0.1476	0.1042	0.0521	0.1389	0.2222	0.1335	0.2848	0.1513	0.5312
S172	0.1130	0.2933	0.0913	0.1490	0.2139	0.0457	0.0986	0.1394	0.2091	0.1504	0.3086	0.1582	0.5126
S173	0.0915	0.0759	0.1808	0.1317	0.1719	0.0313	0.1317	0.1272	0.1853	0.1252	0.3725	0.2472	0.6638
S174	0.0424	0.2031	0.1138	0.1674	0.1786	0.1451	0.0871	0.1004	0.2098	0.1386	0.2903	0.1517	0.5224
S175	0.1521	0.1458	0.1708	0.2313	0.2021	0.0313	0.0000	0.0979	0.1021	0.1259	0.2892	0.1633	0.5646
Mean	0.1006	0.1631	0.1603	0.1787	0.1803	0.1093	0.1020	0.1420	0.1797	0.1462	0.3272	0.1809	0.5530

注： H_s （群体内基因多样性 gene diversity within populations）； H_T （总基因多样性 total gene diversity）； D_{ST} （居群间基因多样性 gene diversity among populations）； G_{ST} （遗传分化系数 genitic differentiation coefficient）。

3 讨论

(1) 刚毛柞柳群体的多态位点百分率（ P ）很高，表明刚毛柞柳是变异很丰富的树种。

(2) Nei 指数和 Shannon 指数由于统计方法的原理不同, 不可避免的在对居群间遗传分化系数的估算上存在偏差 (夏铭等, 2001), 但二者揭示结果是一致的, 即新疆境内刚毛柽柳遗传多样性很丰富, 居群间遗传分化的水平要略高于居群内。

(3) 天然居群的遗传变异是基因流和选择共同作用的动力过程 (赵桂仿等, 2000)。高水平、稳定的基因流可以防止居群间的遗传分化, 使居群趋向于一致, 低水平的基因流易造成居群对局部环境的适应; 而选择则可以不顾基因流的压力而支持在不同种类组成的环境里适应的基因型。同种植物各个居群空间上的隔离、突变、环境因子造成的选择差异、随机遗传漂变、基因流的隔离等都能导致居群基因结构的异质性, 从而促进居群的分化。刚毛柽柳为两性花, 花非常小且密集, 依靠风和昆虫传粉, 本研究所选用的居群之间和个体之间的地理距离又很大, 这使得花粉的有效传播距离有可能小于居群间的地理距离, 使得居群内基因交流频繁, 而居群间很难进行基因交流, 造成居群间较高的遗传分化水平。所以笔者认为维持刚毛柽柳遗传多态现象的机制可能主要是基因流的隔离。

(4) 刚毛柽柳的繁育机制: 王洪新 (1996) 认为对居群内、居群间遗传多样性的分配唯一肯定起作用的是繁育系统。自交植物 G_{ST} 大于 0.51, 这样的群体趋向于形成一个内部均一而互相异质的小群体; 异交植物的花粉散布的很远, 强大的基因流促进了其居群间的基因交换, 以风媒异交为主的群体 G_{ST} 为 0.10, 以虫媒异交为主的群体 G_{ST} 为 0.21。本研究得到刚毛柽柳居群间遗传分化系数在 0.4294 ~ 0.6638 之间, 平均为 0.5530, 可以看出基本符合自交植物的特点, 但又有少量的异交成分, 因此可以基本认为刚毛柽柳的繁育系统属于一种自交和不完全异交混合的交配类型。这也与其两性花、即可自花授粉又可异花授粉的生殖生物学特性相符合。

(5) 分析位点数的多少与所提供信息的量和可靠性之间明显相关。位点数达到 70 个, 得到的遗传信息就比较可靠 (周泽扬等, 1998)。本研究得到刚毛柽柳的位点数 157 个, 足以满足 RAPD 的统计分析。

遗传变异的水平在某种程度上表明了该物种对环境适应的广泛程度, 刚毛柽柳天然居群的遗传多样性丰富, 遗传分化较大。本研究发现, 每个居群都有特异片段, 这是否是其适应不同的生态条件, 对恶劣环境、特别是对新疆极端环境的响应, 还需进一步的研究证实。

致谢 本实验是在新疆大学生命科学院张富春教授的自治区植物资源重点开放实验室完成。

〔参 考 文 献〕

- 中国植物志编委会, 1979. 中国植物志第 50 卷 [M]. 北京: 科学出版社, 142—143
- 刘铭庭, 1995. 柽柳属植物综合研究及大面积推广应用 [M]. 兰州: 兰州大学出版社, 46
- Cheng ZM (程争鸣), Pan HX (潘惠霞), Yin LK (尹林克), 2000. Study on the phytochemistry taxonomy of *Tamarix* Linn and *Myricaria* Desv [J]. *Acta Bot Boreal - Occident Sin* (西北植物学报), 20 (2): 275—282
- King LM, Schaal BA, 1989. Ribosomal-DNA variation and distribution in *Rudbeckia missouriensis* [J]. *Evolution*, 43 (5): 1117—1119
- Nei M, 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations [J]. *Proc Natl Acad USA*, 70: 3321—3323
- Wang HX (王洪新), Hu ZA (胡志昂), 1996. Plant breeding system, genetic structure and conservation of genetic diversity [J].

Chinese Biodiversity (生物多样性), 4 (2): 92—96

- Wei Y (魏岩), Yin LK (尹林克), Tan DY (谭敦炎), 1999. The discussions on the anatomical structure of leaf and its taxonomic relationship of Tamaricaceae in China [J]. *Acta Bot Boreal - Occident Sin* (西北植物学报), 19 (1): 113—118
- Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic marker [J]. *Nucl Acids Res*, 18: 6531—6535
- Xia M (夏铭), Zhou XF (周小峰), Zhao SD (赵士洞), 2001. RAPD analysis on genetic diversity of natural populations of *Pinus koraiensis* [J]. *Acta Ecol Sin* (生态学报), 21 (5): 730—737
- Zeng FJ (曾凡江), Zhang XM (张希明), Li XM (李小明), 2002. A review on the water physiological characteristics of *Tamarix* and its prospect [J]. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 13 (5): 611—614
- Zhai SH (翟诗虹), 1986. The chromosome number of *Tamarix* Linn [J]. *Acta Phytotax Sin* (植物分类学报), 24 (4): 273—274
- Zhao GF (赵桂仿), Francois Felber Philippe Kuepfer, 2000. Subpopulation differentiation of *Anthoxanthum alpinum* (Poaceae) along an altitudinal gradient detected by random amplified polymorphic DNA [J]. *Acta Phytotax Sin* (植物分类学报), 38 (1): 64—70
- Zhang J (张娟), Zhang DY (张道远), Yin LK (尹林克), 2003. Genomic DNA extraction and RAPD experiment conditions of *Tamarix hispida* [J]. *Acta Bot Boreal - Occident Sin* (西北植物学报), 23 (2): 253—256
- Zhou ZY (周泽扬), Xia QY (夏庆友), Lu C (鲁成), *et al*, 1998. The correlation between the number of RAPD-loci and the reliability of the information on genetic variation in molecular phylogenetic studies [J]. *Hereditas* (遗传), 20 (5): 12—15
- Zou YP (邹喻萍), Wang XQ (汪小全), Lei YD (雷一丁), *et al*, 1994. Isolation and characterization of total DNA from several endangered species and their allies [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 36 (7): 528—533